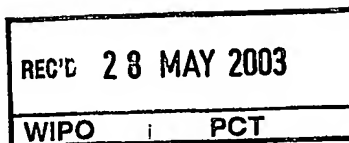


证 明



本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 04 02

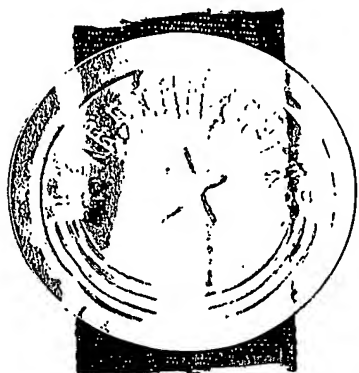
申 请 号： 02 1 11230.4

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 一类甲硫氨酰氨肽酶抑制剂

申 请 人： 中国科学院上海药物研究所

发明人或设计人： 南发俊； 叶其壮； 刘志英； 李静雅



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

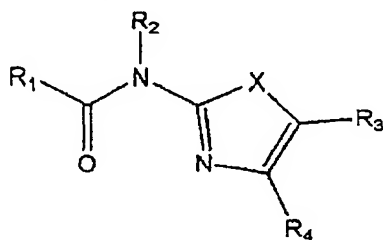
王景川

2003 年 4 月 15 日

BEST AVAILABLE COPY

权利要求书

1. 一类结构式如下的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂



其中 R₁ 为 C₁-C₄ 的烷基、取代烷基、C₃-C₆ 的环烷基、取代环烷基、芳基、吡啶基；由 C₁-C₄ 的烷基、硝基、羧基、醛基、烷氧基、胺基、酰氨基、巯基的取代芳基、取代吡啶基；

R₂ 为 H、C₁-C₄ 烷基、取代烷基、芳基、由 C₁-C₄ 的烷基硝基、羧基、醛基、烷氧基、胺基、酰氨基、巯基的取代芳基；

R₃ 为 H、C₁-C₄ 烷基、取代 C₁-C₄ 烷基、卤素；芳基、取代芳基；

R₄ 为 H、C₁-C₄ 烷基、取代烷基、取代芳基；

X 为 O、S、N、杂原子。

2. 根据权利要求 1 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂，其特征在于：

当 R₁ 为吡啶、取代吡啶包括卤素、酰胺、烷氧基、羟基、羧基、酯基、醚时，

R₂ 为 H；

R₃ 为 H、Br、烷基；

R₄ 为 H、烷基、取代芳基。

3. 根据权利要求 1 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂，其特征在于：

当 R₁ 为芳基、取代芳基包括硝基、胺基、C₁-C₄ 的烷氧基、羟基、羧基、苄基时

R₂ 为 H；

R₃ 为 H、卤素、C₁-C₄ 烷基；

R₄ 为 H、C₁-C₄ 烷基、取代芳基。

4. 如权利要求 1 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法，其特征在于由 Y 为羟

基、卤素或其他活性基团的 R₁COY 与

The chemical structure shows a thiazole ring. At the 1-position, there is a nitrogen atom bonded to an R2 group. At the 2-position of the thiazole ring, there is a substituent X. At the 4-position, there is a substituent R3, and at the 5-position, there is a substituent R4.

5. 根据权利要求 4 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法其特征在于缩合剂为 DCC、EDC、DIC、HBTU。

6. 根据权利要求 4 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法其特征在于缩合反应溶

十

剂为二氯甲烷、二甲基咪唑、二氯乙烷、甲苯、苯、水、二氧六环或上述溶剂的混合溶剂。

7. 根据权利要求 4 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法其特征在于反应温度为 -20°C 至室温或加热温度从 50°C 至 130°C。

8. 根据权利要求 4 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法其特征在于缩合反应时加入活化剂 HOBT、五氟苯酚或分子筛。

9. 根据权利要求 4 所述的甲硫氨酰氨肽酶抑制剂的制备方法其特征在于缩合反应时用三乙胺、二乙丙基乙基胺、吡啶、DMAP 碱作催化剂。

10. 如权利要求 1 所述甲硫氨酰氨肽酶抑制剂作为抗肿瘤或抗感染药物先导化合物。

说明书

一类甲硫氨酰氨肽酶抑制剂

技术领域

本发明涉及的一类小分子有机化合物对甲硫氨酰氨肽酶 (MetAPs) 显示了高的抑制活性, 并对不同的 MetAPs 亚型表现出一定的选择性, 因而可作为一类新的抗肿瘤和抗菌药物研究的先导化合物。

背景技术

在原核细胞的细胞质内所有蛋白质的翻译都起始于 N 端的甲硫氨酸, 然而在真核细胞、线粒体和叶绿体中蛋白质的翻译起始于 N-甲酰化甲硫氨酸, 甲酰化基团一般是在伴随翻译的过程中被去甲酰化酶作用后除去。不论在真核细胞还是在原核细胞中, 甲硫氨酰氨肽酶 (MetAPs) 有选择性的切除新生蛋白或多肽链的 N 端甲硫氨酸。新生蛋白或多肽链 N 端甲硫氨酸的切除对于蛋白的翻译后修饰以及在细胞的准确定位和功能的正常发挥起着关键的作用。

大肠杆菌甲硫氨酰氨肽酶是最先发现的甲硫氨酰氨肽酶成员, 随后人们分别在酵母和哺乳动物中也发现了结构和功能类似的酶。从序列的比较来看, 这类甲硫氨酰氨肽酶的 C 端有着很高的同源性, 但是 N 端却延伸了一段类似锌指结构的序列, 这段序列结构后来被实验证实是与核糖体结合序列, 对蛋白酶活性没有影响 (J. Biol. Chem. 1990; 265: 19892-19897)。该类酶与大肠杆菌甲硫氨酰氨肽酶被划分为 I 型酶; 后来人们从猪肝中分离纯化并克隆到另一类甲硫氨酰氨肽酶 (J. Biol. Chem. 1992; 267: 20667-20673), 序列比较其 C 端与大肠杆菌甲硫氨酰氨肽酶的同源性要比 I 型酶低一些 (C 末端插入了一段约 60 个氨基酸的序列), 在其 N 端是由一些多聚中性和酸性氨基酸残基取代锌指结构序列 (这部分结构被证实是真核细胞内蛋白翻译起始因子磷酸化的抑制子, 并不影响蛋白酶的活性), 为了与 I 型区分, 人们将该类酶分为 II 型酶, 如陆续发现的酵母、果蝇、小鼠和人的 II 型甲硫氨酰氨肽酶。

甲硫氨酰氨肽酶广泛存在于生物界各种生物的细胞中, 对底物具有一定的选择性。不论是内源性的蛋白还是体外重组表达的蛋白或是多肽作为底物的实验都表明 (Biochemistry. 1987; 26: 8242-8246), 只有当蛋白或多肽底物 N 端甲硫氨酸后的第二个氨基酸 (P_1') 属于非极性链小于 3.68Å, 才能被甲硫氨酰氨肽酶酶解。目前认为 P_1' 位置

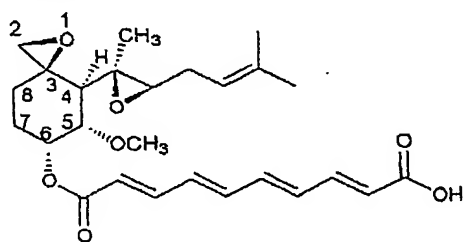
的氨基酸是以下七种氨基酸中任一便能被甲硫氨酰氨肽酶作用: Gly、Ala、Ser、Thr、Pro、Val 和 Cys (J. Bacteriol. 1987;169:751-757; Biochemistry. 1999;38:14810-14819).

甲硫氨酰氨肽酶在细胞内的基本功能是切除细胞内新合成蛋白的 N 端甲硫氨酸, 为蛋白质的后续功能奠定基础. 新生蛋白或多肽链 N 端甲硫氨酸的切除, 对于蛋白的翻译后修饰、在细胞的准确定位、蛋白的直接降解 (J. Biol. Chem. 1982;257:3532-3536) 和功能的正常发挥起着关键的作用。

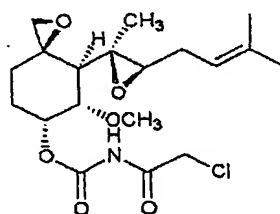
目前甲硫氨酰氨肽酶的抑制剂根据作用方式, 我们可将它们分为共价结合抑制剂和非共价结合抑制剂。另外还有一类抑制剂是过度态类似物和反应产物, 它们也具有相似于 Bestatin 类似物的抑制机理 (Biochemistry. 1999;38:14810-14819)。

通过共价结合方式抑制甲硫氨酰氨肽酶的化合物是一类能够特异抑制血管内皮细胞生长的药物, 烟曲霉素 (fumagillin) 和它的衍生物 TNP-470 (IC_{50} 为纳摩尔级)。研究表明, 人源的 hMetAP II 是细胞内 fumagillin 和 TNP-470 的作用靶点, 该类化合物通过共价修饰 hMetAP II 催化区保守氨基酸残基 His, 从而达到抑制该蛋白酶的活性 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:15183-15188)。

非共价抑制剂是针对于 MetAPs 的底物特性, 以亮氨酰氨肽酶的有效抑制剂 Bestatin 为模板改造的底物类似物抑制剂。将 Bestatin 的 P_1 和 P_1' 位置替之以异亮氨酸和丙氨酸, 结果是一个不能被水解的底物类似物, 它的抑制活性 IC_{50} 为 $5\mu M$, 是目前报道的 eMetAP 最好的抑制剂。

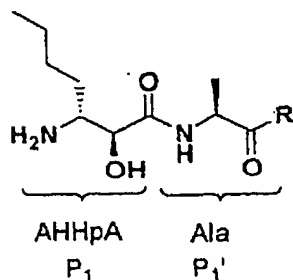


fumagillin



TNP-470

MetAPs 的几个共价结合抑制剂



eMetAP 的非共价抑制剂

8

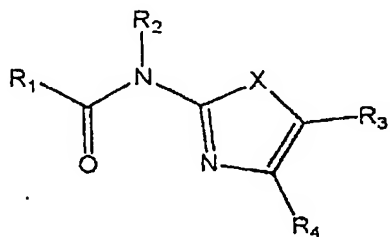
近几年来, 肿瘤化疗取得了相当的进步, 肿瘤患者生存时间明显延长, 特别是对白血病、恶性淋巴瘤等的治疗有了突破, 但对危害人类生命健康最严重的、占恶性肿瘤 90% 以上的实体瘤的治疗未能达到满意的效果。药学家和肿瘤学家越来越深刻地认识到: 要提高肿瘤治疗的疗效, 必须从肿瘤发生发展的机制着手, 才能取得新的突破性进展。抗肿瘤药物正从传统的细胞毒性药物, 向针对机制的多环节作用的新型抗肿瘤药物发展。肿瘤的血管系统是一个崭新的、有希望的抗肿瘤治疗靶点, 因为肿瘤的生长和转移依赖于新生血管生成 (angiogenesis), 肿瘤既可通过肿瘤血管从宿主获取营养和氧气, 又可通过肿瘤血管源源不断地向宿主输送转移细胞, 并在机体的其它部位继续生长和诱导血管生成, 导致肿瘤转移。通过抑制肿瘤血管生成来抑制肿瘤血管生成是当今抗肿瘤药物研究最活跃的领域之一。烟曲霉素及其类似物所具有的抗肿瘤作用, 正是通过作用于肿瘤的血管系统而实现, 通过特异性的抑制血管内皮细胞生长进而抑制肿瘤生长。这说明, 甲硫氨酰氨肽酶特别是 hMetAP_{II} 可作为一种新型的抗新生血管生成药物的作用靶点, 对它有效而特异性的抑制剂可作为新型的抗肿瘤药物。

在原核生物中仅有 MetAP_I, MetAPs 基因的敲除实验表明, 大肠杆菌、伤寒沙门氏菌以及酵母都不能再继续生长, 这说明 MetAP_I 在原核生物的生长过程中非常重要的作用, 因而能选择性抑制 MetAP_I 的化合物有可能作为一类新型的抗细菌感染药物。

发明内容

发明目的: 本发明设计与合成新型的小分子有机化合物作为 MetAPs 抑制剂, 并对其结构与活性关系进行深入的研究, 在阐明 MetAPs 在病理条件下的作用机制的同时找到抗癌、抗感染药物的先导化合物。

本发明所述一类甲硫氨酰氨肽酶抑制剂具有如下结构:



其中 R₁ 为 C₁-C₄ 的烷基、取代烷基、C₃-C₆ 的环烷基、取代环烷基、芳基、吡啶基; 由 C₁-C₄ 的烷基、硝基、羧基、醛基、烷氧基、胺基、酰氨基、巯基的取代芳基、取代吡啶基;

R₂ 为 H、C₁-C₄ 烷基、取代烷基、芳基、由 C₁-C₄ 的烷基硝基、羧基、醛基、烷氧基、胺基、酰氨基、巯基的取代芳基;

9

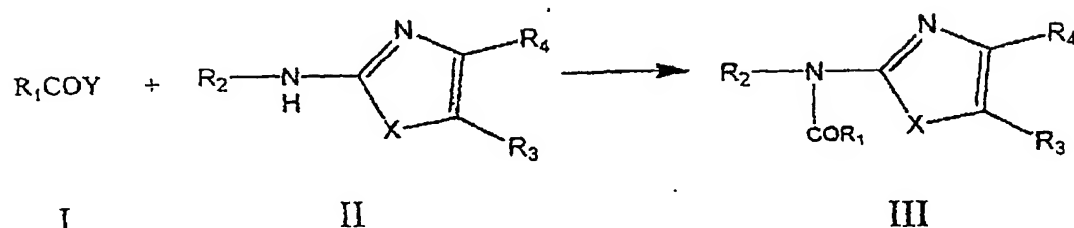
R_3 为 H、 C_1-C_4 烷基、取代 C_1-C_4 烷基、卤素；芳基、取代芳基；

R_4 为 H、 C_1-C_4 烷基、取代烷基、取代芳基；

X 为 O、S、N、杂原子。

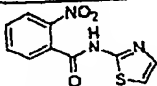
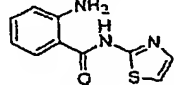
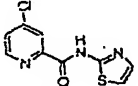
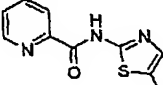
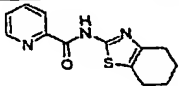
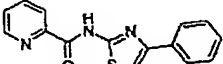
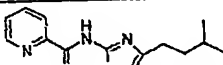
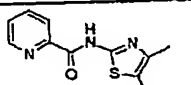
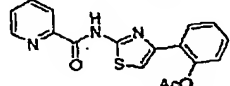
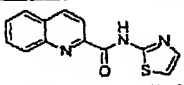
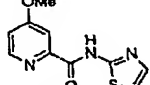
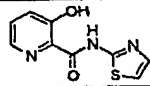
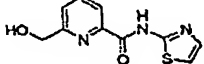
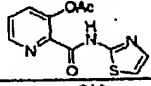
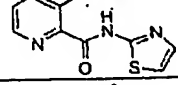
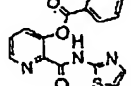
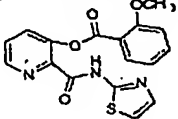
本发明通过下列步骤实施：

根据化学反应式



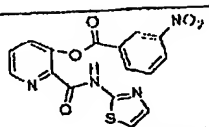
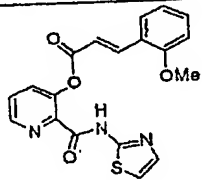
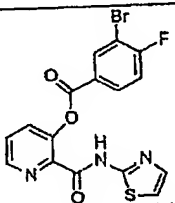
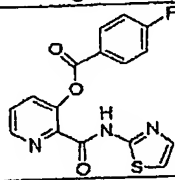
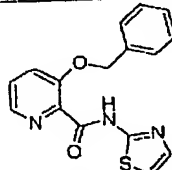
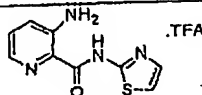
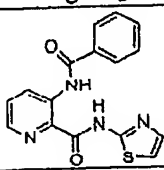
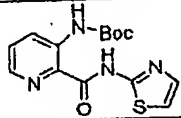
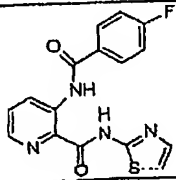
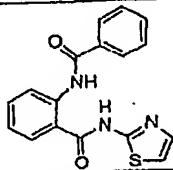
化合物 I 与 II 缩合得化合物 III，其中 Y 为 OH、Cl 或其它活性基团，化合物 I 与 II 在如下溶剂中进行缩合反应， CH_2Cl_2 、DMF、 CH_2ClCH_2Cl 、甲苯、苯、水、二氧六环或在需要时使用混合溶剂，例如： CH_2Cl_2 /DMF (1: 1 V/V)，所使用的缩合剂根据化合物性质可为 DCC、ECD、DIC、HBTU 等，根据反应需要时加入少量活化剂，例如 HOBT、五氟苯酚、分子筛等，有时反应还需加入碱作催化剂，如三乙胺、二乙丙基乙基胺、吡啶、DMAP、通常反应温度从 $-20^{\circ}C$ —室温，但在某些情况下，则需加热，一般从 $50^{\circ}C$ — $130^{\circ}C$ ，反应时间同样视反应物的活化基团而定，例如 Y 为 Cl 时可在几分钟内完成反应，一些反应则需时间长一些，通常用 TLC 来测定反应完成程度，反应完毕后一般用醋酸乙酯或二氯甲烷、氯仿等溶剂提取，依次用 5% HCl、水、饱和食盐水洗，经干燥后，低温减压除去溶剂，浓缩物经柱层析得最终产物 III，产率视反应物 I 和 II 的性质而变化，从 20%—95%，得到的产物用 NMR 等方法来证明

化合物 II 可根据 J. Org. Chem. 63, 196-200 (1998) 的方法合成。

	化学结构	IC ₅₀ (μ M)	
		EMetAP	hMetAP1
6		NA	
7		30% inhibition at 20 μ g/ml	-
16		4.84	-
17		6.0	-
18		NA	-
22		NA	-
23		NA	-
24		NA	-
25		NA	-
27		51.0	-
30		9.22	-
31		2.33	-
32		5.82	-
34		8.20	29.0
35		4.49	20.9
36		1.10	28.7
37		1.90	15.4

02-04-06

11

41		1.91	7.3
44		1.80	-
45		1.35	17.4
46		1.31	7.0
47		5.31	7.8
50		5.56	11.0
51		0.14	-
52		1.25	-
53		0.05	-
54		NA	-

NA: no inhibition at 20 µg/ml, - : no test

生物活性测试

用大肠杆菌系统克隆并大量表达 eMetAP 蛋白,经饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀及 Q-Sepharose 柱层析纯化后,得到脱辅基酶(apo-eMetAP),最后经与适当浓度的两价钴离子孵育后,得到高活性的酶可以进行该酶抑制剂的筛选。

药物筛选模型的测试原理

eMetAP 可以水解合成底物 Met-S-C-Phe 的硫酯键,产物 Met-SH 迅速与过量的 DTNB 反应,产生的 3-巯基-4-硝基硫代苯酚盐在 412 nm 处有吸收($\epsilon_{412}=13600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。通过 SpectraMAX 340 检测 412 nm 处的光吸收变化来确定酶活性。

操作步骤:

采用常规筛选模型

筛选选取 2 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 三个化合物浓度进行初步筛选,当抑制活性高于 50%时,取 8 个浓度测定该活性化合物 IC_{50} 。

本发明的优点:

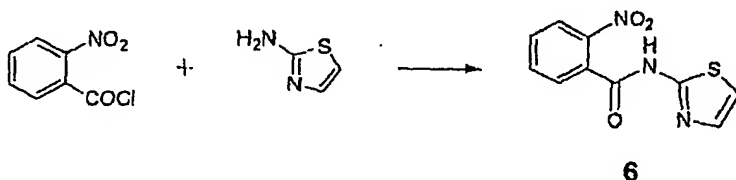
本发明说明合成的一系列化合物为一类全新结构的甲硫氨酰氨酐酶抑制剂,与现在已知的这类酶的抑制剂相比,结构相对简单,易于制备。而且其中的某些化合物对甲硫氨酰氨酐酶 eMetAP 的抑制活性为当前最好的。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但不限制本发明。

¹H-NMR 用 Varian Mercury AMX300 型仪测定;MS 用 VG ZAB-HS 或 VG-7070 型仪测定,除注明外均为 EI 源(70eV);所有溶剂在使用前均经过重新蒸馏,所使用的无水溶剂均是按标准方法干燥处理获得;除说明外,所有反应均是在 Ar 气保护下进行并用 TLC 跟踪,后处理时均经饱和食盐水洗和无水 MgSO₄ 干燥过程;产品的纯化除说明外均使用硅胶(200-300 mesh)的柱色谱法;所使用的硅胶,包括 200-300 目和 GF₂₅₄ 为青岛海洋化工厂或烟台缘博硅胶公司生产。

1. 化合物 6 的制备



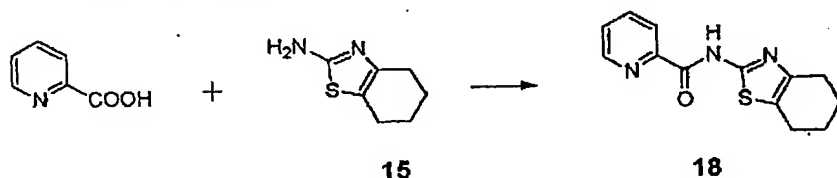
将邻硝基苯甲酰氯(5mmol)溶于二氯甲烷(15ml),加入 2-氨基噻唑(500mg,5mmol),三乙胺(0.75ml,5mmol),室温下反应 8h,加入二氯甲烷稀释淬灭,将所有反应物转移

至分液漏斗中，用 5% 盐酸洗涤。在分液漏斗上层（水层）接近于二氯甲烷层分界处有固体漂浮。将固体用二氯甲烷洗，经柱色谱纯化（石油醚：乙酸乙酯=3：1，V/V）得到白色固体产物 6503mg，产率 40.4%。

^1H NMR (DMSO, 300MHz):

δ (ppm) 8.18(d, J = 8.1Hz, 1H), 7.91–7.86 (m, 1H), 7.82–7.77(m, 2H), 7.55 (d, J = 3.6Hz, 1H), 7.34 (d, J = 3.6 Hz, 1H)

2. 化合物 18 的制法



将 15 (195mg, 1.26mmol), 2-羧基吡啶 (156mg, 1.26mmol), DCC (270mg, 1.30mmol), DMAP (11mg, cat) 的混合物中加入二氯甲烷 (5ml), 氮气保护, 室温下搅拌 8 小时。用乙酸乙酯稀释, 过滤, 滤液蒸除溶剂, 残留物经柱色谱纯化 (石油醚：乙酸乙酯=4：1, V/V) 得到 247mg 白色固体产物 18, 产率 75.7%。

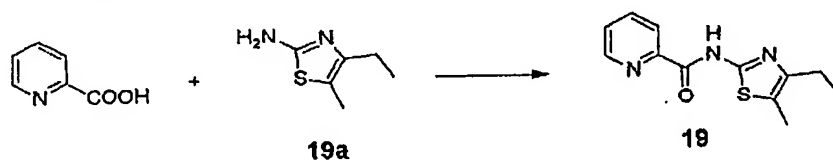
^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 11.08(s, 1H), 8.62 (d, J = 5.2Hz, 1H), 8.27 (d, J = 7.8Hz, 1H), 7.92(dt, J = 7.8, 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 7.8, 5.2 Hz, 1H), 2.72 (d, J = 13.5 Hz, 4H), 1.88(s, 4H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm)

161.76(1C), 154.61(1C), 148.76(1CH), 148.18(1C), 145.17(1C), 137.90(1CH), 127.33(1CH), 123.59(1C), 122.91(1CH), 26.65(1CH₂), 23.56(1CH₂), 23.23(2CH₂);

3. 化合物 16 的制法:

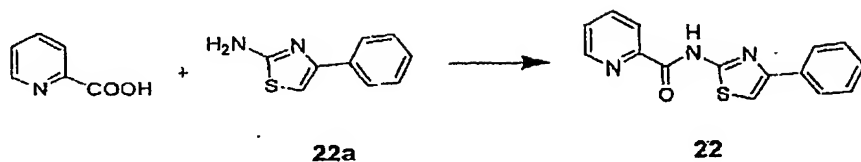


将 16 (28mg, 0.197mmol), 2-羧基吡啶 (25mg, 0.197mmol), DCC (43mg, 0.20mmol), DMAP (cat) 的混合物中加入二氯甲烷 (1ml), 氮气保护, 室温下搅拌 8 小时。用乙酸乙酯稀释, 过滤, 滤液蒸除溶剂, 残留物经柱色谱纯化 (石油醚：乙酸乙酯=5：1, V/V), 得到 14mg 白色固体产物 19。产率 75.7%。

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 11.02(s, 1H), 8.61 (dd, J = 4.8, 1.5Hz, 1H), 8.27 (d, J = 7.5Hz, 1H), 7.91(dt, J = 7.5, 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.50 (ddd, J = 7.5, 4.8, 1.5 Hz, 1H), 2.62 (q, J = 7.5, 7.5, 7.5 Hz, 2H), 2.34(s, 3H), 1.22 (t, J = 7.5, 7.5 Hz, 3H);

4. 化合物 22 的制备:



将 22a (23mg, 0.131mmol), 2-羧基吡啶 (17mg, 0.131mmol, 1eq), DCC (29mg, 0.14mmol), DMAP (cat) 的混合物中加入二氯甲烷 (2ml), 氩气保护, 室温下搅拌 8 小时。用乙酸乙酯稀释, 过滤, 滤液蒸除溶剂, 残留物经柱色谱纯化(石油醚: 乙酸乙酯=5: 1, V/V)得到 21mg 青色固体产物 22。

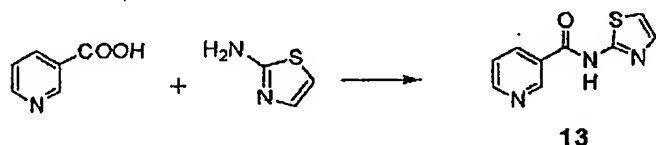
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 11.25 (s, 1H), 8.66 (d, $J = 4.5\text{Hz}$, 1H), 8.30 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 7.92 (dd, $J = 7.8, 7.8\text{Hz}$, 1H), 7.89 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H), 7.53 (dd, $J = 7.8, 4.5\text{Hz}$, 1H), 7.43 (t, $J = 7.8, 7.8\text{Hz}$, 2H), 7.33 (t, $J = 7.8, 7.8\text{Hz}$, 1H), 7.22 (s, 1H);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm)

162.34(1C), 157.45(1C), 150.73(1C), 148.86(1CH), 147.98(1C), 138.02(1CH), 134.63(1C), 128.98(2CH), 128.27(1CH), 127.59(1CH), 126.34(2CH), 123.08(1CH), 108.21(1CH);

5. 化合物 25 的制法:



将 烟酸 (123mg, 1mmol) 中加入 2-氨基噻唑 (100mg, 1mmol), DCC (200mg, 1.1mmol, 1.1eq), HOBT (145mg, 1.4mmol), 氩气保护下, 注入重蒸 DMF (1ml)。室温下搅拌反应约 8 小时后加入乙酸乙酯稀释。过滤, 滤液蒸除溶剂, 残留物经柱色谱纯化(石油醚: 乙酸乙酯=1: 1, V/V)得到白色固体产物 13 50mg。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 9.27 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 8.88 (dd, $J = 4.8, 1.5\text{Hz}$, 1H), 8.32 (dt, $J = 7.8, 1.8, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.51 (dd, $J = 7.8, 4.8\text{Hz}$, 1H), 7.10 (d, $J = 3.6\text{Hz}$, 1H), 7.03 (d, $J = 3.6\text{Hz}$, 1H);

EIMS (m/z): 206 ($M+1$, 4%), 205 (M^+ , 21), 172 (33), 106 (99), 78 (100), 69 (21).

6. 化合物 36 的制备

将 33(20mg,0.09mmol)溶于二氯甲烷 (4ml), 加入三乙胺 (0.1ml), -78℃下注入苯甲酰氯 (0.13mmol, 1.5eq), 保持同温下反应 3h, 自然升至室温, 再反应 2h, 得到淡黄色溶液。抽干, 溶于二氯甲烷/甲苯, 经柱色谱纯化(石油醚 : 乙酸乙酯=3 : 1, V/V)得到化合物 38。

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 11.33(br, 1H), 8.60(d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 8.29 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.75-7.63(m, 3H), 7.56 (t, $J=4.5, 4.5\text{Hz}$, 2H), 7.50(d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 7.05 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H).

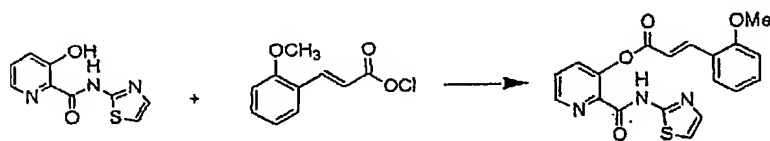
^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm)

165.13(1C), 160.29(1C), 157.82(1C), 148.59(1C), 146.03(1CH), 139.88(1C), 137.87(1CH), 134.12(1CH), 133.90(1CH), 130.85(2CH), 129.13(1C), 128.88(2CH), 128.74(1CH), 113.83(1CH);

EIMS (m/z): 325(M^+ , 7%), 226(8), 197(6), 127 (16), 105(69)

97 (53), 91 (69), 85 (63), 71 (100), 69(88);

7. 化合物 44 的合成



44

将 33 (98mg,0.45mmol) 中加入二氯甲烷 (8ml), 再加入三乙胺 (0.1ml,68mg,0.67mmol), 然后将溶于二氯甲烷的酰氯在-78℃下加入。同温下反应 1h, 然后自然升至室温, 继续反应过夜。反应液淡黄色混浊。抽干, 溶于二氯甲烷/甲苯, 经柱色谱纯化(石油醚 : 乙酸乙酯=3 : 1, V/V)得到 48mg 白色固体产物, 为化合物 44:

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 8.55(dd, $J=4.2, 1.5\text{Hz}$, 1H), 8.25 (d, $J=16\text{Hz}$, 1H), 7.69-7.59(m, 3H), 7.51 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.40(dt, $J=8.0, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.03-6.94 (q, $J=8.0, 18\text{Hz}$, 2H), 6.99 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H);

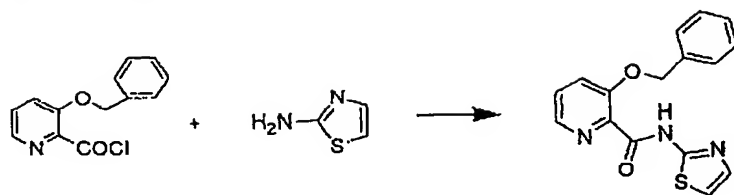
^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm)

165.67(1C), 160.45(1C), 158.89(1C), 157.80(1C), 148.49(1C), 145.75(1CH), 143.47(1CH), 139.98(1C), 138.09(1CH), 133.86(1CH), 132.35(1CH), 129.76(1CH), 128.62(1CH), 123.16(1C), 120.91(1CH), 116.93(1CH), 113.75(1CH), 111.38(1CH), 55.67(1CH₃);

EIMS (m/z): 381(M^+ , 7%), 353 (8), 324(16), 225 (52), 221(26)

161 (90), 127 (28), 123 (47), 95 (49), 71 (60), 69 (100).

8. 化合物 47 的制备



47

室温下在酰氯中加入二氯甲烷 (2ml), 再加入 2-氨基噻唑 (11.4mg, 0.114mmol), 氩气保护, 加入三乙胺 (19 μ l, 0.114mmol), 反应过夜。抽干, 加入二氯甲烷 (10ml), 用水洗 (3 \times 3ml), 饱和食盐水洗 (3ml), 干燥 (无水 MgSO_4)。过滤, 滤液浓缩, 溶于二氯甲烷, 经柱色谱纯化 (石油醚 : 乙酸乙酯 = 1 : 1, V/V) 得到 6mg 红色固体产物, 为化合物 47:

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

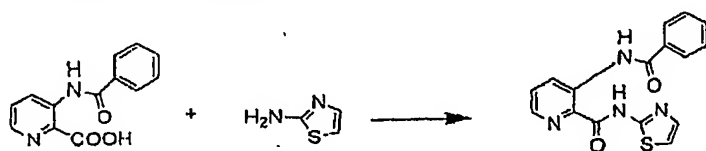
δ (ppm) 8.25 (dd, $J = 2.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.52–7.50 (m, 3H), 7.42–7.32 (m, 5H), 7.02 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ (ppm)

161.30(1C), 158.38(1C), 156.33(1C), 140.73(1CH), 137.80(1CH), 136.47(1C), 135.85(1C), 129.06(2CH), 128.54(1CH), 128.42(1CH), 127.12(1CH), 127.06(1CH), 123.50(1CH), 113.64(1CH), 71.14(1CH₂);

EIMS (m/z): 311 (M^+ , 6%), 220 (7), 197(8), 189 (43), 123 (19), 111 (29), 97 (44), 91(100), 85 (55), 71(83), 69 (78).

9. 化合物 51 的制备



51a

51

将 51a (40mg, 0.165mmol) 中加入 DCC (41mg, 0.198mmol), DMAP (10mg, 0.083mmol, 0.5eq)、活化的 4A 分子筛 (100mg), 氩气保护下, 注入重蒸甲苯 (1ml), 室温搅拌 20min, 加入 2-氨基噻唑 (17mg, 0.165mmol), 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1.5 小时。过滤, 滤液直接上柱, 经柱色谱纯化 (石油醚 : 乙酸乙酯 = 3 : 1, V/V) 得到白色固体产物 4mg。

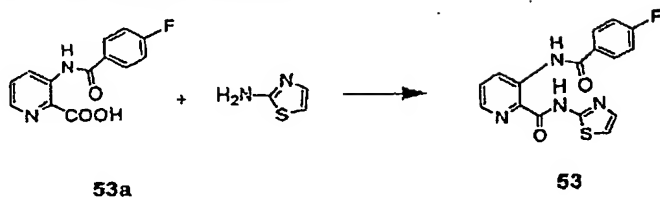
^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz):

δ (ppm) 9.40 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H), 8.36 (dd, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.12–8.09 (m, 2H), 7.62–7.55 (m, 5H), 7.09 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H);

EIMS (m/z): 324 (M^+ , 7), 239(6), 225 (19), 197 (11), 125 (25), 121 (11), 111(39), 97

(60), 85 (65), 71 (100), 69 (96).

10. 化合物 53 的制备



将 53a (75mg, 0.288mmol) 中加入 DCC (77mg, 0.375mmol, 1.3eq)、DMAP (18mg, 0.144mmol, 0.5eq)、活化的 4A 分子筛 (100mg), 氮气保护下, 注入重蒸甲苯 (1ml), 室温搅拌 20min, 加入 2-氨基噻唑 (29mg, 0.288mmol), 70℃ 下搅拌 3 小时。过滤, 滤液直接上柱, 经柱色谱纯化 (石油醚 : 乙酸乙酯 = 1 : 1, V/V) 得到 13mg 白色固体产物, 化合物 53。

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz):

δ (ppm) 12.49 (s, 1H), 11.38 (br., 1H), 9.36 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 4.5, 0.9 Hz, 1H), 8.14-8.10 (m, 2H), 7.61-7.57 (m, 2H), 7.28-7.22 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H);

¹H, ¹H-COSY NMR (CDCl₃, 300MHz):

相关峰: CH-CH-CH, CH(2H)-CH(2H), CH-CH;

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz): δ (ppm)

167.27(1C), 165.53(1C), 165.12(1C), 163.91(1C), 157.06(1C), 142.79(1CH),
139.47(1C), 138.62(1CH), 131.52(1C), 130.33(1CH), 130.21(1CH), 129.17(1CH),
129.04(1CH), 116.45(1CH), 116.16(1CH), 114.46(1CH);

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.